

## Válasz Prof. Dr. Szijártó Attila bírálataira

Ezúton is szeretném megköszönni Professzor Úr munkáját, a bírálatra szánt idejét, a részletes értékelést és az MTA Doktori értekezés pozitív bírálatát.

A felvetett kérdésekre, a válaszaim a következők:

*1.) Ahogy a dolgozat is említi a preszepszin szintet nagyban befolyásolhatja a vesefunkció romlása. Tekintve, hogy májcirrhosis esetén gyakran kell számolni vese diszfunkcióval, így tervezik-e a preszepszin szint meghatározását veseparaméterek függvényében (pl.: kreatinin, GFR). Ezek korrelációjával felállítható-e egy a vesefunkciót is alapul vevő „re- kalkulált” küszöb érték, mely vesebetegség mellett is megbízhatóan jelzi a bakteriális fertőzés felléptét?*

### Válasz:

A bíráló által felvetett módszertani megközelítés nagyon értékes segítség lehet a májcirrhosisos betegek bakteriális infekciójának diagnosztikája során, mely potenciálisan lehetővé teszi a preszepszin meghatározásnak az eddigieknél jóval hatékonyabb alkalmazását. A mindennapi klinikai gyakorlatban a veseelégtelenség jelenléte esetén egy re-kalkulált preszepszin küszöb érték használata egyszerűen kivitelezhető, valószínűleg jól működő módszer lehet. Jól példázza ezt egy japán munkacsoport nemrégiben megjelent eredménye (*Takahashi G, Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;86:205-10.*). A szerzők sürgősségi osztályon jelentkező betegek (n=91) 0., 1., 3., 5. és 7. napos mintájának felhasználásával [n=403]) esetén értékelték a preszepszin diagnosztikus hatékonyságát sepszissel járó bakteriális infekciók azonosításában akut veseelégtelenségben szenvedő (AKI) és nem szenvedő (non-AKI) betegekben. Az AKI fennállását 3 különböző módszerrel értékelték: Neutrophil gelatinase-asszociált lipokalin (NGAL $\geq$ 150 ng/mL), Cystatin C ( $\geq$ 0,98 mg/L) vagy alacsony eGFR (<60 mL/min per 1,73m<sup>2</sup>). Ezen laboratóriumi kritériumok figyelembevételével, az akut veseelégtelenségben szenvedő betegekben egy re-kalkulált, magasabb preszepszin küszöbérték meghatározásával a molekula diagnosztikus hatékonysága nemcsak hogy nem adódott alacsonyabbnak a normál vesefunkciójú beteghez viszonyítva, hanem még jobb diagnosztikus hatékonyságot is eredményezett. A 3 különféle AKI marker esetén a re-kalkulált preszepszin küszöbértékek nagyon hasonlóan adódtak, mint ahogyan a diagnosztikus hatékonyságot jellemző különféle paraméterek is (AUC, szenzitivitás és specificitás). További értékes adat, hogy AKI esetén a re-kalkulált preszepszin küszöbérték diagnosztikus hatékonysága szignifikánsan magasabbnak adódott a procalcitoninéhoz képest (**1. táblázat**). Tekintve, hogy az infekció laboratóriumi diagnosztikájában a mindennapi klinikai gyakorlatban jelenleg a C-reaktív protein (CRP) mellett a procalcitonint (PCT) használjuk ezen adatok akár a preszepszin a PCT-vel szembeni előnyben részesítéshez is vezethetnek AKI jelenléte esetén, amennyiben ezek az eredmények a későbbiekben nagy esetszámú betegkohorszban validálásra kerülnek. Perspektivikusan a preszepszin akár le is válthatja a PCT-t azon betegcsoportokban, ahol a bakteriális infekció gyakran jár AKI-val, mint például májcirrózisban. Ezen betegcsoportban ugyanis a betegség akut rosszabbodást gyakran kíséri AKI, az esetek mintegy 40%-ban. A japán munkacsoport vizsgálatához hasonló elemzést májcirrózisos betegekben eddig nem végeztek.

### 1.táblázat Procalcitonin (PCT) és a preszepszin (PSEP) küszöbértékek a szepszis diagnosztikájában AKI és non-AKI betegek esetén

Cut-off values of PCT and PSEP for diagnosing sepsis in non-AKI and AKI patients.

		AUC	Cut-off	Sensitivity	Specificity	Youden Index	
NGAL	Non-AKI	PCT	0.67	0.85 ng/mL	0.68	0.58	0.21
		PSEP	0.75	694 pg/mL	0.69	0.81	0.45
	AKI	PCT	0.72	2.01 ng/mL	0.57	0.81	0.25
		PSEP	0.83*	828 pg/mL	0.81	0.71	0.45
CysC	Non-AKI	PCT	0.67	0.85 ng/mL	0.42	0.83	0.47
		PSEP	0.77**	684 pg/mL	0.63	0.88	0.48
	AKI	PCT	0.82	0.94 ng/mL	0.69	0.79	0.30
		PSEP	0.85	891 pg/mL	0.83	0.69	0.49
eGFR	Non-AKI	PCT	0.69	0.86 ng/mL	0.45	0.85	0.49
		PSEP	0.79*	694 pg/mL	0.66	0.87	0.50
	AKI	PCT	0.81	1.14 ng/mL	0.69	0.79	0.34
		PSEP	0.84	891 pg/mL	0.86	0.62	0.45

AUC = area under curve.

\*  $P < 0.05$  versus PCT,

\*\*  $P < 0.01$  versus PCT

Az általunk vizsgált és a disszertációban bemutatott májbetegkohorszban NGAL és CysC meghatározások nem történtek. Az AKI jellemzésére az a becsült glomeruláris filtrációs ráta (eGFR) értéket pedig nem használtuk, mert azt a veseműködés megítélésre jelenleg májcirrhosisban nem javasolják (1D). Az AKI definíciójára vizsgálatunkban, az abban az időben az EF-CLIF által javasolt aktuális fix kreatinin (sCr) értéket ( $\geq 133 \mu\text{mol/L}$ ) használtuk. Az újabb irodalmi adatok alapján azonban már tudjuk, hogy a sCr értékelésekor májcirrózisos betegek esetén szintén óvatosság szükséges; ascites jelenléte és folyadéktúlsúly esetén ugyanis az aktuális sCr túlbecsüli a tényleges értéket (1A). Az akut veseműködés romlást sokkal inkább jellemzi a sCr érték dinamikus változása, mintsem annak egy adott pillanatban mért értéke. Az AKI jelenlegi meghatározása:  $\geq 26,5 \mu\text{mol/L}$  48 óra alatt vagy  $\geq 50\%$ -os emelkedése a bazális értékhez viszonyítva 7 nap alatt. Az AKI jelenléte esetén súlyosságának meghatározása: AKI 1. stádium:  $\geq 26,5 \mu\text{mol/L}$ , a bazális érték  $\geq 1,5$ - $2x$ -ére emelkedik, 2. stádium: a bazális érték  $> 2$ - $3x$ -ára emelkedik, 3. stádium: a bazális érték  $> 3x$ -ára  $> 354 \mu\text{mol/L}$ ,  $\geq 26,5 \mu\text{mol/L}$  akut emelkedéssel). A bazális értéknek a megelőző 3 hónapban mért értéket kell tekinteni. Amennyiben több érték is rendelkezésre áll, azt az adott kórházi felvételhez legközelebbi értéket kell használni, amikor még a beteg állapota stabil volt. Ha nem áll rendelkezésre korábbi adat, akkor a felvétel napján mért értékhez kell a sCr szint változásait viszonyítani (*Nadim MK. 2016;64:717-35.*).

Ez természetesen tovább bonyolítja a preszepszin „re-kalkulált” küszöbértékének meghatározási módját májcirrózisan. Mindazonáltal hálásan köszönjük, hogy a bíráló felhívta a figyelmünket arra, hogyan tudnánk a disszertációban közölt kutatásunkat komplexebb megközelítésben tovább folytatni és így vélhetőleg még értékesebb eredményeket felmutatni.

A preszepszin és a PCT AKI illesztett „re-kalkulált” küszöbértékének és diagnosztikus hatékonyságának meghatározását a májcirrózishoz társuló bakteriális infekciókban haladéktalanul megfogjuk tenni. A vizsgálathoz rendelkezésre áll egy új, több mint 1200 akut dekompenzációban szenvedő májcirrózisos betegkohorsz klinikai adat- és biobankja, mely a PREDICT vizsgálatban (Predicting Acute-on-Chronic Liver Failure in Cirrhosis) (2016-2018) került összegyűjtésre.

2.) *Májcirrhosishoz társuló ascites diagnosztikus csapolása gyakori. A disszertációban szereplő szolúbilis PRR-k megjelenek-e a szabad hasi folyadékban? Történt-e saját kutatás ez irányban, illetve ha igen, ez mutat-e összefüggését a cirrhosis súlyosságával?*

**Válasz:**

Májcirrózisos betegekben a lektin komplement útvonal szolúbilis PRR fehérjéinek [mannózkötő lektin (MBL) és fikolinok (FCN-2 és FCN-3)] vizsgálatát csak szérumból végeztük el, ascitesből fehérjeszint meghatározás nem történt. A vizsgált prospektív betegkohorszban ascites minták nem kerültek gyűjtésre.

Májcirrózisos betegekben elsőként 2018-ban egy dán munkacsoport (*Glargaard S és mtsai. Scand J Gastroenterol. 2018;53:64-69.*) ismertette azon eredményeit, miszerint májcirrózisos betegek ascitesében különféle szolúbilis PRR fehérjék (FCN-1, FCN-2, FCN-3 és MBL) és komplement molekulák (C4 és C3) jelenlétét tudták kimutatni. A 34 beteget magában foglaló pilóta vizsgálatban kimutatták, hogy az ascites folyadékban a FCN-1, FCN-2, MBL, C4 és C3 fehérjék jelen vannak. Az ascites szolúbilis PRR és komplement fehérje szintek csökkenése jó korrelációt mutatott a máj szintetikus működésének zavarásával (szérumból bilirubin, INR érték). Előrehaladott májcirrózisban (Child C stádium, n=16, 47%) szintjük szignifikánsan alacsonyabb, mint a kevésbé súlyos betegségstádium esetén (Child B stádium, n=18, 53%) (p=0,001-0,027). Az ascites szolúbilis PRR fehérje szintek kb. egy nagyságrenddel alacsonyabbak a szérumból mért értékeknél, azonban jó korrelációt mutatott azokkal (p értékek változása > 0,001-0,007). A munkacsoport obszervációs követéses vizsgálat során elemezték a szolúbilis PRR fehérjék és komplement molekulák előrejelző értékét a betegségprogresszió szempontjából. Multivariációs Cox-regressziós analízist használva igazolták azt is, hogy az alacsony ascites FCN-1 (p=0,036) és C3 (p=0,025) szint a halálozás és/ vagy májtranszplantáció elvégzésének betegség súlyosságától független kockázati tényezői.

Nőgyógyászati kórképekben már jóval korábban bizonyítást nyert az MBL molekulának a peritoneális folyadékban való jelenléte. Egy lengyel munkacsoport korai munkájában beszámolt arról, hogy ovárium carcinomás nőbeteg (n=54) ascitesében a medián MBL szint nagyjából a szérumból mért 1/5-nek felel meg (*Swierzko AS, Cancer Immunol Immunother. 2007;56:959-71.*)

3.) *Vizsgálta-e későbbi tanulmányok során ANCA IgA antitestek jelenlétét különböző mucosalis felszíneken, illetve azon szervekben, szövetekben ahol a bakteriális transzlokáció várható (pl. máj, ascites)? Várható-e különbség ezekben a szövetekben, lehet-e ennek további klinika jelentősége?*

**Válasz:** A bakteriális transzlokációban érintett mucosalis felszíneken és a különféle szervrendszerekben az ANCA IgA antitestek vizsgálatára egyelőre még nem került sor. Az antitestek szövetekben történő vizsgálata egyelőre nehézségekbe ütközik. Mivel májcirrózisban az ANCA IgA antigénje(i) nem a klasszikus antigén(ek) (PR3 és MPO), melyet kutatómunkánk során igazoltunk és nem is ismertek egyelőre, így azok szövetekben történő vizsgálata immunhisztokémiai vagy immunfluoreszcens módszerekkel egyelőre nem lehetséges.

További kutatásainkban elsőként az ANCA IgA antigén(ek) azonosítását tervezzük, ANCA IgA pozitív betegek szérumból 2D elektroforézissel és Western-blott vizsgálattal PMN-lizátumon (I). Amennyiben sikerül az autoimmune májbetegségekhez hasonlóan egy vagy több

adott ANCA antigént azonosítani, az antitestek jelenlétének vizsgálata lehetségessé válik a különféle kompartmentekhez tartozó szöveti mintákban. Az ANCA antigén(ek) azonosításával párhuzamosan *in vitro* vizsgálatokat is tervezünk azon hipotézisünk alátámasztására, mely szerint különböző bakteriális komponensek (TLR ligandok, mint LPS, FimH adhesin, bakteriális DNS CpG-ODN) képesek a B-sejt proliferációra és differenciációjára kifejtett hatásuk révén fokozott IgA, részben IgA típusú ANCA képződést indukálni májcirrhosisban (II).

Tekintve, hogy munkacsoportunk egyik kiemelt érdeklődési területe a májcirrhózisban észlelt fokozott IgA válasz kialakulásának és klinikai jelentőségének megértése, így jelenleg is aktív kutatómunka zajlik ezen a területen, a 2019-ben az European Foundation for Study of Chronic Liver Disease (EF-CLIF)-vel közösen elnyert H2020 pályázat támogatásával (*MICROBiome-based biomarkers to PREDICT decompensation of liver cirrhosis and treatment response* Project Number: 825694). Munkacsoportunk a pályázatban a bél barrier károsodás szerepének vizsgálatával foglalkozik a krónikus májbetegségekre rakódott akut májelégtelenség (ACLF) kialakulásában. A PREDICT tanulmány során májcirrhózis akut dekompenzációjában szenvedő betegektől endoszkópos vizsgálatok révén nyert intesztinális szöveti mintákon (gyomor, vékony- és vastagbél, n=100) immunhisztokémiai és immunfluoreszcens módszerekkel jellemezzük (1) a bélnyálhártya B sejt populációját. Igazolni tervezzük továbbá, (2) hogy a betegek bélnyálkahártyájában az IgA termelő plazmasejtek mennyisége felszaporodik. Jellemezzük a lokális IgA alosztály típusokat (IgA1 és IgA2 arány), illetve a J-lánc ezzel párhuzamos celluláris expresszióját, mely kulcsfontosságú a di- és polimer Ig képződésben. Vizsgáljuk továbbá a szekretoros komponens (SC, polimer Ig receptor) fokozott epiteliális expresszióját is.

Az irodalmi adatok és saját szerológia eredményeink tükrében kiemelten fontosnak tartjuk az immunosuppresszív IgA+ B-sejtek vizsgálatát a szisztémás keringésben és ezzel párhuzamosan a különféle szöveti kompartmentekben (béltraktus, máj) is. A májcirrhózis kórlefordása során a szisztémás gyulladásos válasz és az immundeficiencia dinamikus együttes jelenléte jellemző, mely cirrhózis-asszociált immundeficiencia (CAID) szindrómaként ismert. A májelégtelenség súlyosbodásával a bakteriális transzlokáció proinflammatorikus immunválaszok kialakulásához vezet, ugyanakkor a folyamatos és növekvő bakteriális expozíció miatt az immunrendszer kimerül és az immundeficiens CAID fenotípus kerül előtérbe, melyet anti-inflammatorikus citokinek (mint pl. IL-10) termelésének és negatív regulátorok (mint pl. PD-L1) expressziójának növekedése kísér. Ezeknek a folyamatoknak egyik szereplője lehet a *Shalapour S. és mtsai* által vizsgált regulatórikus tulajdonságokat mutató B-sejt populáció. Humán és egérmodellben végzett vizsgálataikban IgA termelő B-sejtek akkumulációját mutatták ki nem alkoholos zsírmájban (NASH), mely sejtek PD-L1-t és IL-10-t is expresszálnak, így közvetlenül gátolják a tumorelleses citotoxikus T-sejtek működését és elősegítik a hepatocelluláris karcinóma (HCC) kialakulását. A jól ismert mikrobiális homeosztázist fenntartó intesztinális B-sejtektől elkülönült populációt képező, a krónikus májgyulladás során képződő immunosuppresszív IgA+ B-sejtek eliminálásával vagy PD-L1 gátlással a daganatképződés csökkenthető. (*Shalapour S és mtsai. Nature 2017;551:340-*). Egy másik tanulmányban, szepszisben szenvedő betegek perifériás vérében B-sejtek PD-L1+ expressziójának emelkedését mutatták ki (*Wilson et al. Critical Care 2018; 22:95*). Ezen irodalmi adatok alapján feltételezhetjük, hogy primer szklerotizáló kolangitiszes (PSC) és alkoholos májcirrhosisos betegek esetén is kimutatható az immunosuppresszív B-sejtek számának emelkedése a béltraktusban, a májszövetben és a szisztémás keringésben. Jelenlétük pedig egyrészt összefüggést mutathat kolangiocelluláris karcinóma (CCA) kialakulásával PSC-ben, másrészt pedig a HCC, valamint a szisztémás infekciók fokozott gyakoriságú kialakulásával

alkoholos májcirrhosisban. Ez utóbbit támogathatja, az a megfigyelés miszerint a szepsis során is, hasonlóan a májcirrhosisban észlelt CAID-hoz, az immunrendszer aktivációját immunszuppresszió követi. A jövőben akár az immunszuppresszív IgA+ B-sejtek eliminálásával vagy PD-L1 gátlással a daganatképződés és a szisztémás infekciók kialakulása csökkenthető lesz az immunrendszer homeosztázisának visszaállításával.

Még egyszer szeretném megköszönni Professzor Úr részletes értékelését, a további szakmai munkámat segítő javaslatait és az MTA doktori értekezés pozitív bírálatát.



Dr. Papp Mária  
egyetemi docens

Debrecen, 2019. november 08.